

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Juni 2001 (14.06.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/42309 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C08B (DE). JACOBASCH, Gisela [DE/DE]; Ahornstrasse 4, 16348 Wandlitz (DE). SCHMIEDL, Dettlef [DE/DE]; Gormanstrasse 20a, 10119 Berlin (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/12459
- (22) Internationales Anmeldedatum: 9. Dezember 2000 (09.12.2000) (74) Anwälte: MAI, Peter usw.; John-F.-Kennedy-Strasse 4, 65189 Wiesbaden (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): AU, CA, CN, JP, KR, NO, NZ, RU, US.
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (30) Angaben zur Priorität: 199 59 863.0 10. Dezember 1999 (10.12.1999) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): CELANESE VENTURES GMBH [DE/DE]; 65926 Frankfurt (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BENGIS, Holger [DE/DE]; Bindingstrasse 3, 60598 Frankfurt am Main
- Veröffentlicht:**
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD OF INCREASING THE \$G(A)\$-AMYLASE-RESISTANT STARCH CONTENT (RS CONTENT) OF A POLYSACCHARIDE, POLYSACCHARIDES, THE USE THEREOF AND FOOD CONTAINING SAID POLYSACCHARIDES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ERHÖHUNG DES GEHALTES AN α -AMYLASE-RESISTENTER STÄRKE (RS-GEHALT) EINES POLYSACCHARIDS, POLYSACCHARIDE, DEREN VERWENDUNG UND LEBENSMITTEL MIT DIESEN POLYSACCHARIDEN

(57) Abstract: The invention relates to a method of increasing the α -amylase-resistant starch content (RS content) of a polysaccharide. The inventive method is characterized by incubating the polysaccharide used with less than an equivalent weight of water, cooling it, optionally drying it and obtaining a polysaccharide that has an increased RS content vis-à-vis the polysaccharide used.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erhöhung des Gehalts an α -amylase-resistenter Stärke (RS-Gehalt) eines Polysaccharids, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man das eingesetzte Polysaccharid bei Wasserunterschluß, inkubiert, danach abkühlt, gegebenenfalls trocknet und ein Polysaccharid mit gegenüber dem eingesetzten Polysaccharid erhöhtem RS-Gehalt gewinnt.

WO 01/42309 A2

Verfahren zur Erhöhung des Gehaltes an α -amylase-resistenter Stärke (RS-Gehalt) eines Polysaccharids, Polysaccharide, deren Verwendung und Lebensmittel mit diesen Polysacchariden

Der Einsatz resistenter Stärken (RS) hat für die Lebensmittel-industrie eine zunehmend größere Bedeutung. Aus dem Abbau von RS-Produkten gewinnt der Organismus nur in geringem Umfang Energie. Diese Energiezufuhr bezieht sich vorwiegend auf den oxidativen Abbau resorbierter kurzkettiger Fettsäuren aus dem Dickdarm. Diese kurzkettigen Fettsäuren sind Endprodukte des Kohlenhydratstoffwechsels der intestinalen Mikroflora. Mit der Aufnahme RS-haltiger Lebensmittel sind zwei Funktionen verknüpft, Substratbereitstellung für den Energiestoffwechsel der intestinalen Mikroflora und den der Dickdarmepithelzellen. Letztere sind zur Aufrechterhaltung ihrer Struktur und Funktion auf eine luminale Zufuhr der kurzkettigen Fettsäuren und insbesondere von Butyrat angewiesen.

BESTÄTIGUNGSKOPIE

tion auf eine luminale Zufuhr der kurzkettigen Fettsäuren und insbesondere von Butyrat angewiesen.

Seit langem ist bekannt, daß der Gehalt an verzweigtem Amylopektin in Stärken, die gewöhnlich aus Amylose und Amylopektin variierender Zusammensetzung bestehen, durch gezielte enzymatische Behandlung reduziert wird, wodurch der Anteil an kurzkettigen Amylosestrukturen erhöht werden kann (**US Patent 3,729,380**). Es ist ebenfalls bekannt, daß derartige Produkte eine stärkere Tendenz zur Retrogradation als native Stärken besitzen. Bei diesem Prozeß der Retrogradation bilden sich sogenannte α -amylase-resistente Stärkestrukturen aus. Als resistente Stärke (RS) werden Kohlenhydratpolymere bezeichnet, die durch α -Amylase nicht abgebaut werden. Sie stellen dadurch eine energiereduzierte, körpergebende Komponente in Lebensmittelzusammensetzungen im Sinne eines Ballaststoffes dar. Die Behandlung mit entzweigenden Enzymen findet aus technischen Gründen gewöhnlich in einem nicht zu konzentrierten wässrigen Stärkekleister statt.

EP 0 564 893 A1 beschreibt und beansprucht einen Prozeß für die Herstellung eines RS-Produktes, das bis zu 15 % RS enthält. Dieser Prozeß ist dadurch gekennzeichnet, daß die wässrige Suspension einer Stärke, die mindestens 40 % Amylose enthält, verkleistert und enzymatisch durch Behandlung mit einem Enzym, das die α -1,6-glykosidischen Bindungen öffnet, entzweigt und anschließend das entstandene Zwischenprodukt retrogradiert wird. Nach **EP 0 564 893 A1** liegt die optimale Stärkekonzentration in der Suspension bei 15 % und die Beispiele dieser EP-Patentanmeldung illustrieren den Prozeß, wenn die Stärkekonzentrationen entweder auf 14 % reduziert bzw. auf 17 % erhöht werden. Das Ausgangsmaterial enthält mindestens 40 % Amylose und ist eine Maisstärke. Es wird weiterhin ge-

zeigt, daß bei einem Amylosegehalt von 25 % durch diesen Prozeß keine resistente Stärke (RS) gebildet wird. Außerdem wird nachgewiesen, daß bei Erhöhung des Amylosegehaltes über 40 % auf bis zu 100 % ein Produkt erzeugbar ist, daß bis zu 50,3 % RS enthält.

EP 0 688 872 A1 beschreibt und beansprucht einen Prozeß für die Herstellung eines RS-haltigen Produktes, das 25 bis 50 Gew.-% an RS enthält. Entsprechend den Angaben beschreibt und beansprucht **EP 0 688 872 A1** einen Prozeß für die Herstellung eines RS-haltigen Produktes, in dem eine wässrige Suspension einer partiell abgebauten, verkleisterten Stärke enzymatisch entzweigt und das Zwischenprodukt retrogradiert wird.

(In diesem Zusammenhang wird als „partiell abgebaute Stärke“ ein Polymer verstanden, das durch geeignete Behandlung im Molekulargewicht reduziert wurde, wobei die Verkürzung der Kettenlänge sowohl die Amylose als auch das Amylopektin betrifft. Die Degradation schließt sowohl Hydrolyseprozesse (säure- oder enzymkatalysiert) als auch Extrusion, Oxidation oder Pyrolyse ein.)

Besonders hervorgehoben werden säureabgebaute Wurzel- oder Knollenstärken sowie Maltodextrine von Wurzel- oder Knollenstärken. Maltodextrine sind durch einen DE-Wert (DE: Dextrose Äquivalent) im Bereich von 1 bis 19 charakterisiert. Sie werden aus Kartoffel- oder Tapiokastärke, die bis zu 25 % Amylose enthalten, hergestellt. Die wässrige Suspension solcher Maltodextrine enthält für den Prozeß einen Feststoffanteil von 20 Gew.-% oder mehr. Die Maltodextrine sind weiterhin dadurch charakterisiert, daß sie hohe Gehalte an Oligomeren mit Polymerisationsgraden kleiner als 10 ($DP < 10$) von bis zu 22 Gew.-% enthalten sowie ein mittleres Molekulargewicht von 1,3680

$\times 10^4$ g/mol besitzen. Die entzweigenden Enzyme, die für den bekannten Prozeß genutzt werden, sind Pullulanase und Isoamylase. Am Ende der enzymatischen Behandlung wird eine Retrogradation in einem Temperaturbereich von 0 bis 30 °C in einem Zeitintervall von 1 bis zu 3 Tagen durchgeführt, in dem man das wässrige Reaktionsprodukt stehen läßt. Anschließend wird das Produkt durch Sprühtrocknung getrocknet. Es wird ein pulverförmiges Produkt mit einem RS-Gehalt bis zu maximal 60 Gew.-% hergestellt.

In DE 198 29 240.6 werden α -amylase-resistente Polysaccharide beschrieben, die nach einem Verfahren erhältlich sind, umfassend folgende Schritte:

- a) Herstellung einer Suspension oder Dispersion aus wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukanen) und Wasser;
- b) Erwärmung der Suspension oder Dispersion;
- c) Abkühlung des erhaltenen Kleisters und Retrogradation des Kleisters bei einer gegenüber der Temperatur des erhitzten Kleisters erniedrigten Temperatur; und
- d) ggfs. Trocknung des erhaltenen Produktes.

Die Erfindungsbeschreibung dient dem Ziel, Kohlenhydratpolymere mit einem hohen Anteil resistenter, relativ thermostabiler Strukturen noch ökonomischer herzustellen, um sie etwa in der Lebensmittelherstellung einsetzen zu können.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung versteht man unter einem RS-Gehalt den Gehalt an α -amylase-resistenten Polysacchariden, wie er nach der Methode von Englyst et al. (Classification and measurement of nutritionally important starch fractions, European Journal of Clinical Nutrition, 46

(Suppl. 23) (1992) 33-50) bestimmt werden kann; s. auch **Beispiel 3**.

Unter dem Begriff "hoher RS-Gehalt" versteht man einen RS-Gehalt von mindestens 25 %, bevorzugt von 65 bis 75, 75 bis 88, 88 bis 90, 90 bis 95 und insbesondere 95 bis 99 oder mehr Gew.-%.

Unter dem Begriff "wasserunlöslich" versteht man Verbindungen, die nach der Definition des Deutschen Arzneimittelbuches (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft/Stuttgart & Gori-Verlag/Frankfurt, 9. Aufl., 1987; s. auch **Beispiele 4 bis 5**) unter die Kategorie "schwer lösliche" Verbindungen, "sehr schwer lösliche" oder "praktisch unlösliche" Verbindungen fallen.

Der Fachmann ist mit den Begriffen "Suspension" und "Dispersion" vertraut. Ergänzend sei verwiesen auf Römpp, Chemie-Lexikon, 9. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart & New York, Seiten 4401 bzw. 1010.

Der Fachmann ist ferner mit dem Begriff "Kleister" vertraut. Ergänzend sei verwiesen auf Römpp, Chemie-Lexikon, 9. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart & New York, Seite 2256.

Zur dynamischen Differenzkalometrie (DSC) vgl. Gruchala & Pomeranz in Cereal Chemistry, 70 (1993) 163-170.

Gemäß einer Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Erhöhung des Gehalts an α -amylase-resistenter Stärke (RS-Gehalt) eines Polysaccharids, dadurch **gekennzeichnet**, daß man

- das eingesetzte Polysaccharid bei Wasserunterschluß
- inkubiert,
- danach abkühlt,
- gegebenenfalls trocknet und
- ein Polysaccharid mit gegenüber dem eingesetzten Polysaccharid erhöhtem RS-Gehalts gewinnt.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann dadurch **gekennzeichnet** sein, daß man einmal oder mehrmals inkubiert.

Ferner kann das erfindungsgemäße Verfahren dadurch **gekennzeichnet** sein, daß man das Verfahren bei einem Wassergehalt von $\leq 50\%$ und insbesondere $\leq 35\%$ (Gewicht/Gewicht) durchführt, bezogen auf das Gesamtgewicht von Polysaccharid und Wasser.

Ferner kann das erfindungsgemäße Verfahren dadurch **gekennzeichnet** sein, daß man bei eingestelltem Wasserunterschluß die Inkubation bei einer Temperatur T_{Prozess} durchführt, die oberhalb der Glasübergangstemperatur T_g und unterhalb der Umwandlungstemperatur T_{Transf} liegt ($T_g < T_{\text{Prozess}} < T_{\text{Transf}}$), wobei die Temperatur T_{Prozess} während der Inkubation in dem genannten Bereich schwanken kann.

Ferner kann das erfindungsgemäße Verfahren dadurch **gekennzeichnet** sein, daß es sich bei der Umwandlungstemperatur T_{Transf} um die mittlere Zersetzungstemperatur des eingesetzten Polysaccharids handelt: $T_{\text{Trans}} = T_{\text{Zersetzung}}$.

Ferner kann das erfindungsgemäße Verfahren dadurch **gekennzeichnet** sein,

- (i) daß es sich bei der Temperatur T_{Prozess} um eine Temperatur handelt, die
- kleiner als die DSC-Endtemperatur T_c (Endtemperatur T_c der dynamischen Differenzkalorimetrie) und/oder
 - kleiner als die DSC-Peak-Temperatur T_p und/oder
 - kleiner als die DSC-Onset-Temperatur T_o ist, wobei
- (ii) gegebenenfalls die Umwandlungstemperatur T_{Transf} gleich der DSC-Endtemperatur T_c oder der DSC-Peak-Temperatur T_p oder der DSC-Onset-Temperatur T_o ist.

Ferner kann das erfindungsgemäße Verfahren dadurch **gekennzeichnet** sein, daß man zum Trocknen eine Sprüh- oder Gefriertrocknung durchführt.

Ferner kann das erfindungsgemäße Verfahren dadurch **gekennzeichnet** sein, daß man ein Poly-(1,4- α -D-glukan) einsetzt.

Ferner kann das erfindungsgemäße Verfahren dadurch **gekennzeichnet** sein, daß man von wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukanen) ausgeht, die aus Biotransformation, aus Umsetzung mit Enzymen oder aus Umsetzung von Saccharose mit einem Enzym der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase gewonnen worden sind.

Die Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens können dadurch gekennzeichnet sein, daß man von Poly-(1,4- α -D-glukanen) ausgeht, die aus Biotransformation, aus Umsetzung mit Enzymen oder aus Umsetzung von Saccharose mit einem Enzym der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase gewonnen worden sind; vgl. beispielsweise WO 95 31 553.

Unter einer Amylosucrase versteht man ein Enzym, das die folgende Reaktion katalysiert:



Ausgehend von diesem Reaktionsschema können lineare oligomere oder polymere $\alpha\text{-1,4-Glukane}$ als Akzeptoren für eine kettenverlängernde Reaktion dienen, die zu wasserunlöslichen Poly-(1,4- $\alpha\text{-D-glukanen}$) führt, deren Glukosereste durch $\alpha\text{-1,4-glykosidische}$ Bindungen verknüpft sind und die ein Molekulargewicht im Bereich von $0,75 \times 10^2$ g/mol bis 10^7 g/mol aufweisen.

Die linearen oligomeren oder polymeren Akzeptoren können dabei entweder von außen zugesetzt werden, sie können jedoch auch, wie in **Beispiel 1** beschrieben, durch die Amylosucrase selbst aus Saccharose erzeugt werden.

$\alpha\text{-1,6-glykosidische}$ Bindungen sind in diesen Produkten per ^{13}C -NMR nicht nachweisbar (Remaud-Simeon et al. in Carbohydrate Bioengineering (ed. S. B. Petersen et al.), Elsevier Science B.V. (1995), 313-320).

Auch wasserunlösliche Poly-(1,4- $\alpha\text{-D-glukane}$), die die eben beschriebenen Eigenschaften aufweisen, aber auf anderem Wege erzeugt worden sind, können Ausgangsstoffe des erfindungsgemäßen Verfahrens sein.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man wasserunlösliche Poly-(1,4- $\alpha\text{-D-glukane}$) als Ausgangsstoffe, die durch die Umsetzung von Saccharose mit einem Enzym mit der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase unter Einsatz von verzweigten Polysaccharidakzeptoren, wie z.B. Glykogen, Amylopektin, Dextrin, gewonnen werden können. Die Amylosucrase katalysiert eine $\alpha\text{-1,4-Glukan-}$

kettenverlängerung an diesen verzweigten Polysaccharidakzeptoren. Die dabei entstehenden wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukane) weisen im Vergleich zu den eingesetzten verzweigten Polysaccharidakzeptoren einen geringeren Verzweigungsgrad auf. Auch diese Produkte werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Poly-(1,4- α -D-glukane) bezeichnet.

Auch solche wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukane), die die eben beschriebenen Eigenschaften aufweisen, aber auf anderem Wege erzeugt worden sind, können Ausgangsstoffe des erfindungsgemäßen Verfahrens sein.

Ferner kann das erfindungsgemäße Verfahren dadurch **gekennzeichnet** sein, daß die Poly-(1,4- α -D-glukane) chemisch in an sich bekannter Weise modifiziert sind.

So können die Poly-(1,4- α -D-glukane) durch Veretherung oder Veresterung in 2-, 3- oder 6-Position chemisch modifiziert worden sein. Der Fachmann ist mit chemischer Modifizierung hinlänglich vertraut; vgl. beispielsweise folgende Literatur:

1. Functional Properties of Food Components, 2nd edition, Y. Pomeranz, Academic Press (1991).
2. Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Belitz & Grosch, Springer Verlag (1992).
3. Citrat Starch Possible Application as Resistent Starch in Different Food Systems, B. Wepner et al., European Air Concerted Action, Abstract: air3ct94-2203, Functional Properties of Non-digestible Carbohydrates, Pro Fibre-Tagung, Lissabon, Februar 1998, Seite 59.

Ferner kann das erfindungsgemäße Verfahren dadurch **gekennzeichnet** sein, daß das Poly-(1,4- α -D-glukan) in 6-Position einen Verzweigungsgrad von höchstens 0,5 % aufweist.

Ferner kann das erfindungsgemäße Verfahren dadurch **gekennzeichnet** sein, daß das Poly-(1,4- α -D-glukan) in 2- und/oder 3-Position einen Verzweigungsgrad von jeweils höchstens 1,0 % und insbesondere höchstens 0,5 % aufweist.

Ferner kann das erfindungsgemäße Verfahren dadurch **gekennzeichnet** sein, daß das Poly-(1,4- α -D-glukan) ein Molekulargewicht von $0,75 \times 10^2$ bis 10^7 , bevorzugt 10^3 bis 10^6 und bevorzugt von 10^3 bis 5×10^5 g/mol aufweist.

Ferner kann das erfindungsgemäße Verfahren dadurch **gekennzeichnet** sein, daß die wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukane) weder entzweigt, insbesondere weder enzymatisch entzweigt, noch hinsichtlich ihrer Kettenlänge (und damit hinsichtlich ihres Molekulargewichts) reduziert worden sind, insbesondere nicht durch Enzymkatalyse, Säurekatalyse, Extrusion, Oxidation oder Pyrolyse.

Schließlich kann das erfindungsgemäße Verfahren dadurch **gekennzeichnet** sein, daß man ein stärkehaltiges Polysaccharid einer Wasserlöslichkeit der Klasse 6 bis 7 gemäß DAB gewinnt (nicht-kaltwasser-löslich).

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein stärkehaltiges Polysaccharid, das nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlich ist.

Ferner betrifft die Erfindung ein Polysaccharid mit hohem Gehalt an α -amylase-resistenter Stärke (RS-Gehalt), das dadurch

gekennzeichnet ist, daß sein RS-Gehalt und/oder sein Gehalt an Kristalltyp A abnimmt, wenn man das Polysaccharid bei Wasserüberschuß inkubiert, insbesondere bei einem Wassergehalt > 50 % und speziell > 35 % (Gewicht/Gewicht).

Das erfindungsgemäße Polysaccharid weist ein charakteristisches Verhältnis von Kristalltyp A oder Kristalltyp B auf, der sich beispielsweise nach dem erfindungsgemäßen Verfahren einstellt, das bei Wasserunterschluß arbeitet, so daß verständlich wird, daß der Gehalt an Kristalltyp A abnimmt, wenn man das erfindungsgemäße Polysaccharid bei Wasserüberschuß inkubiert.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine Verwendung eines erfindungsgemäßen Polysaccharids für Lebensmittel-Vorprodukte oder Lebensmittel.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine Verwendung eines erfindungsgemäßen Polysaccharids als Lebensmitteladditiv oder Lebensmittelzusatzstoff.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung schließlich ein Lebensmittel-Vorprodukt oder Lebensmittel, das durch einen Gehalt an einem erfindungsgemäßen Polysaccharid gekennzeichnet ist.

Beispiel 1: Biotransformation

In ein 5 l-Gefäß wurden 5 l einer sterilisierten 30-proz. Saccharose-Lösung gegeben. Ein Enzymextrakt, der eine Amylosucrase aus *Neisseria polysaccharea* enthielt (s. **WO 95 31 553**), wurde in einer Portion zugegeben und gemischt. Die eingesetzte Enzymaktivität betrug in diesem Experiment 148000 Units. Das verschlossene Gefäß wurde bei 37 °C inkubiert. Während der

Dauer der Biotransformation bildete sich ein weißer Niederschlag. Die Reaktion wurde nach 39 h beendet. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, bei -70 °C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Die Masse des gefriergetrockneten Feststoffes betrug 526,7 g (70,2 % Ausbeute).

Zur Abtrennung niedermolekularer Zucker wurden 200 g des Feststoffes mit Wasser 30 min unter Rühren bei Raumtemperatur gewaschen, bei -70 °C eingefroren und gefriergetrocknet. Der Gehalt an Fruktose und Saccharose wurde nach Lösen des Feststoffes in DMSO durch einen gekoppelten enzymatischen Assay gemäß STITT et al. (Meth. Enzym., 174 (1989) 518 - 552) bestimmt und betrug 4,61 mg Fruktose pro 100 mg Feststoff (4,6 %). Der Gehalt an Saccharose lag unter der Nachweisgrenze.

Der Überstand der Biotransformation wurde bei 95 °C denaturiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde erneut zentrifugiert. Der klare Überstand wurde bei -70 °C eingefroren und über 3 Tage bei 4 °C aufgetaut. Der so erzeugte Niederschlag wurde bei -70 °C eingefroren und gefriergetrocknet.

Zur Abtrennung niedermolekularer Zucker wurden 39,5 g des Feststoffes mit Wasser 30 min unter Rühren bei Raumtemperatur gewaschen, bei -70 °C eingefroren und gefriergetrocknet. Der Gehalt an Fruktose und Saccharose wurde nach Lösen des Feststoffes in DMSO durch den genannten gekoppelten enzymatischen Assay bestimmt und betrug 2,27 mg Fruktose pro 100 mg Feststoff. Der Gehalt an Saccharose lag unter der Nachweisgrenze.

Beispiel 2: Ausgangsmaterial

Bestimmung des Molekulargewichts des mit Amylosucrase synthetisierten wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukans) aus **Beispiel 1 (Figur 1)**

Es wurden 2 mg des Poly-(1,4- α -D-glukans) aus **Beispiel 1** bei Raumtemperatur in Dimethylsulfoxid (DMSO, p.a. von Riedel-de-Haen) gelöst und filtriert (2 μ m). Ein Teil der Lösung wurde in eine Säule der Gelpermeationschromatographie injiziert. Als Elutionsmittel wurde DMSO verwendet. Die Signalintensität wird mittels eines RI-Detektors gemessen und gegen Pullulanstandards (Firma Polymer Standard Systems) ausgewertet. Die Flußrate beträgt 1,0 ml pro Minute.

Die Messung ergab ein Zahlenmittel des Molekulargewichts (M_n) von 2.326 g/mol und ein Gewichtsmittel des Molekulargewichts (M_w) von 3.367 g/mol. Die Wiederfindungsrate beträgt 100 %.

Beispiel 3

Beispiel zur Bestimmung des RS-Gehaltes.

200 mg (Trockengewicht) eines auf seinen RS-Gehalt zu analysierenden pulverförmigen Produktes wurden nach der Methode von Englyst et al. (Eur. J. Clin. Nutrition, 46 (1992) (Suppl. 2) S 33-550) zur Bestimmung des RS-Gehaltes mit der beschriebenen Enzymmischung bei pH 5,2 120 min inkubiert. Nach Beendigung des enzymatischen Abbaus wurde die Aktivität der Enzyme durch Erniedrigung des pH-Wertes auf einen Wert von 3 und der Temperatur auf 20 °C gestoppt. Anschließend erfolgte durch Zugabe der 4-fachen Menge an Ethanol die Einstellung einer 80-proz. (v/v) ethanolischen Lösung. Die 80-proz. ethanolische Lösung

wurde für 1 h bei Raumtemperatur stehengelassen. Das Präzipitat wurde zentrifugiert (2500 x g, 10 min) und der Überstand verworfen. Der Rückstand wurde dreimal mit 80-proz. (v/v) Ethanol und einmal mit absolutem Ethanol gewaschen und zentrifugiert. Der Rückstand wurde lyophilisiert und gewogen. Der Kohlenhydratgehalt des Rückstandes wurde bestimmt und der RS-Gehalt nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{RS [\%]} = 100 \times \text{Kohlenhydratgehalt/Einwaage (Trockengewicht)}$$

Beispiel 4

Bestimmung der Löslichkeit von Polysacchariden und Klassifizierung nach Deutschem Arzneimittelbuch (DAB)

564 mg Poly-(1,4- α -glukan) (siehe **Beispiel 1**) wurden in ca. 0,5 l bidestilliertem Wasser bei 1,3 bar und 130 °C für 1,5 Stunden in einem Autoklaven erhitzt (Apparat Certoclav). Von dem Reaktionsgefäß war zuvor das Gewicht bestimmt worden. Danach wurde die Apparatur entspannt und bei Raumtemperatur abgekühlt. Der Inhalt wurde gewogen. Er entspricht 501,74 g. Nach weiteren 24 Stunden wurde zentrifugiert und dekantiert. Der feste Rückstand wurde getrocknet und ausgewogen. Es waren 468 mg. Daraus errechnete sich ein gelöster Anteil von 96 mg. Bezogen auf das eingesetzte Lösungsmittel errechnete sich daraus, daß für 1 mg Poly-(1,4- α -glukan) 5226 mg Wasser notwendig waren. Gemäß der Klassifizierung nach Deutschem Arzneimittelbuch ergab sich daraus die Einteilung, daß diese Substanz „sehr schwer löslich“ ist, da zwischen 1.000 und 10.000 Teilen Lösungsmittel notwendig waren, um 1 Teil der Substanz in Lösung zu bringen. Dies entsprach von den 7 Klassen zur Einteilung der Löslichkeit (von „sehr leicht löslich“ (Klasse 1) bis „praktisch unlöslich“ (Klasse 7)) der Klasse Nummer 6.

Beispiel 5

Bestimmung der Löslichkeit von Polysacchariden und Klassifizierung nach Deutschem Arzneimittelbuch (DAB)

Der Versuch wurde wie in **Beispiel 4** durchgeführt. Der einzige Unterschied bildete ein Kühlprozeß, der nach der Autoklavbehandlung und dem Abkühlen auf Raumtemperatur nachgeschaltet wurde. Das Substanzgemisch wurde für 3 Stunden bei 5 °C aufbewahrt.

Es wurden 526 mg Poly-(1,4- α -glukan) auf ca. 480 ml bidestilliertem Wasser eingewogen. Nach der thermischen Behandlung ergab sich eine Auswaage von 468,09 g. Das getrocknete Sediment betrug 488 mg. Demnach waren 38 mg des Poly-(1,4- α -glukans) in Lösung gegangen. Dies entsprach einem Verhältnis von 1 mg Substanz zu 12.305 Teilen Lösungsmittel. Demnach war die Substanz nach dieser Behandlungsmethode in Klasse Nummer 7 nach DAB einzustufen und danach als praktisch unlöslich zu klassifizieren, weil mehr als 10.000 Teile Lösungsmittel für ein Teil Substanz benötigt wurden.

Beispiele 6 bis 9

Es wurden Polyglukane als Ausgangsmaterialien gemäß Beispiel 1 hergestellt (Proben 275, 283, 291 und 292). Die Herstellung erfolgte durch Molekulargewichtsaufbau (Synthese mit Amylose-succrace in Saccharose, Fällungspolymerisation).

Eine thermische Analyse (DSC) des Polyglukans von Beispiel 6 (Probe 275; vgl. auch DE 198 30 618.0) ergab, daß das Produkt durch drei Umsetzungen charakterisiert ist.

Bereich 1 ist charakterisiert durch

$$T_o = 85,9; T_p = 97,9, T_c = 101,1 \text{ } ^\circ\text{C}, dH = 1,7 \text{ mJ/mg.}$$

Bereich 2 ist charakterisiert durch

$$T_o = 111,8; T_p = 126,1; T_c = 133,9 \text{ } ^\circ\text{C}, dH = 4,0 \text{ mJ/mg.}$$

Bereich 3 ist charakterisiert durch

$$T_o = 138,1; T_p = 157,6; T_c = 172,5^\circ\text{C}, dH = 23,0 \text{ mJ/mg.}$$

Bedingt durch den zweiten und dritten Bereich ist das Produkt als thermisch sehr stabil einzuschätzen.

Das Produkt enthält keine Verzweigungen.

Die Polyglukane der Beispiele 7 bis 9 (Proben 283, 291 und 292) sind alle Poly-1,4- α -D-glukane mit unterschiedlichem mittleren Molekulargewicht. In den Produkten ist eine Verzweigung nicht nachweisbar. Alle Produkte enthalten auch noch geringe Anteile an Fruktose.

Mit diesen Polyglukanen wurden RS-haltige Präparate hergestellt, die die in den **Tabellen 1 bis 3** zusammengefaßten RS-Gehalte sowie DSC-Parameter T_o , T_p , T_c und dH aufweisen.

Tab. 1 Einfluß der einstündigen Hitze-Behandlung (HB) unter variierenden Feuchtegehalten (Feuchte: 30 bis 57 %) bei einer Temperatur von 120 °C auf den RS-Gehalt und DSC-Parameter (T_o , T_p , T_c und dH) der RS-haltigen Polyglukanprobe 283 ($M_w = 21270$ g/mol).

Proben- bezeich- nung	HB-Bedingungen		RS [%]	DSC-Parameter			
	Temperatur [°C]	Feuchte [%]		T_o [°C]	T_p [°C]	T_c [°C]	dH [mJ/mg]
	-	-	65,0	91,3	110,3	121,6	15,9
283	120	-	-	-	-	-	-
		10	-	-	-	-	-
		20	-	-	-	-	-
		30	71,2	109,7	122,1	131,0	7,9
		40	68,2	111,0	124,2	136,0	6,9
		50	75,0	112,9	130,2	168,6	37,2
		57	70,0	116,9	134,7	168,6	24,1

Tab. 2 Einfluß der einstündigen Hitze-Feuchte- (HFB) bzw. Hitze-Behandlung (HB) unter variierenden Prozeßbedingungen (Temperatur: 105 bis 125 °C; Feuchte 3 bis 57 %) auf den RS-Gehalt und DSC-Parameter (T_o , T_p , T_c und dH) der RS-haltigen Polyglukanprobe 291 ($M_w = 10600$ g/mol).

Proben- bezeich- nung	HB-Bedingungen		RS [%]	DSC-Parameter			
	Temperatur [°C]	Feuchte [%]		T_o [°C]	T_p [°C]	T_c [°C]	dH [mJ/mg]
291	-	-	57,3	84,1	114,2	124,6	12,8
	105	3,56	74,4	85,1	115,5	131,7	16,3
		10	86,5	91,7	116,5	128,2	12,4
		20	82,6	94,7	116,5	124,9	10,1
		30	68,1	98,6	116,5	127,8	15,7
		40	64	102,9	119,5	129,5	11,9
		50	59,2	111,4	121,9	131,4	10,1
		57	59,7	-	124,9	-	-
	110	3,56	82,1	-	-	-	-
		10	85,4	90,0	115,9	125,9	10,7
		20	80,6	97,7	118,5	125,4	8,1
		30	75,9	99,5	118,5	129,5	13,9
		40	66,1	106,4	122,2	131,9	10,9
		50	66,6	108,4	127,6	139,2	9,0
		57	62,9	112,6	128,3	137,5	5,0
	115	3,56	69,5	89,2	115,9	125,5	10,8
		10	69,4	90,8	115,3	126,6	12,9
		20	76,1	98,7	117,2	129,3	16,9
		30	69,3	105,2	120,6	131,0	13,9
		40	61,9	109,2	124,6	136,9	10,7
		50	58,4	112,5	129,5	137,5	3,8
		57	57,9	115,7	135,0	165,6	23,1
	120	3,56	77,2	89,6	114,9	124,9	9,2
		10	85,8	86,5	115,5	125,6	12,8
		20	86,4	92,4	155,5	127,8	16,3
		30	69,7	105,4	121,5	132,5	11,1
		40	63,0	108,5	123,0	134,7	9,7
		50	63,9	112,4	128,3	139,5	7,6
		57	59,8	111,4	129,9	145,1	12,2
	125	3,56	76,0	-	-	-	-
		10	82,3	87,7	115,9	126,7	18,7
		20	72,9	100,4	119,5	133,2	18,1
		30	72,0	106,0	122,9	132,1	9,8
		40	62,2	112,6	128,3	136,2	5,9
		50	59,1	115,0	135,3	162,2	27,4
		57	53,5	117,5	136,7	163,2	23,7

Tab. 3 Einfluß der einstündigen Hitze-Feuchte- (HFB) bzw. Hitze-Behandlung unter variierenden Prozeßbedingungen (Temperatur: 105 bis 125 °C; Feuchte 3 bis 57 %) auf den RS-Gehalt und DSC-Parameter (T_o , T_p , T_c und dH) der RS-haltigen Polyglukanprobe 292 ($M_w = 8300$ g/mol).

Proben- bezeich- nung	HB-Bedingungen		RS [%]	DSC-Parameter			
	Temperatur [°C]	Feuchte [%]		T_o [°C]	T_p [°C]	T_c [°C]	dH [mJ/mg]
292	-	-	58,8	76,0	106,1	123,4	14,6
	105	4,13	60,7	-	-	-	-
		10	73,4	-	-	-	-
		20	75,3	84,7	111,5	121,6	9,8
		30	75,9	90,9	116,2	121,1	7,2
		40	72,9	96,5	120,5	138,3	19,1
		50	65,3	102,5	121,6	132,7	9,3
		57	58,4	100,7	125,3	139,5	18,0
	110	4,13	73,2	-	-	-	-
		10	84,9	-	-	-	-
		20	80,5	-	-	-	-
		30	77,0	91,2	115,9	133,7	17,3
		40	69,2	98,1	121,2	143,7	16,8
		50	60,9	105,7	127,6	138,7	8,6
		57	64,4	105,8	125,6	144,1	18,9
	115	4,13	69,4	108,8	112,4	122,3	0,7
		10	77,5	107,4	114,5	125,5	1,4
		20	85,1	88,1	107,1	125,3	10,6
		30	76,2	91,5	116,2	131,5	17,0
		40	68,4	98,0	119,5	136,6	16,3
		50	66,0	103,5	105,4	108,3	0,8
				111,0	122,9	131,8	4,3
		57	63,4	107,8	127,6	136,7	6,1
	120			143,4	161,2	174,7	7,4
		4,13	76,7	78,1	105,8	129,0	11,4
		10	87,6	82,5	109,1	130,1	16,0
		20	83,2	89,4	114,9	130,5	17,2
		30	72,4	99,5	120,2	142,7	18,8
		40	66,3	104,3	126,3	144,6	17,1
		50	64,7	106,7	131,3	148,5	14,8
		57	54,6	110,1	131,6	146,2	10,1
	125	4,13	77,0	-	-	-	-
		10	83,8	-	-	-	-
		20	87,8	90,8	118,5	134,1	20,7
		30	76,3	99,4	124,6	144,5	18,6
		40	67,9	103,4	130,6	149,2	18,2
		50	63,7	108,9	131,3	150,0	16,7
		57	57,3	108,0	132,9	144,1	9,4

Patentansprüche

1. Verfahren zur Erhöhung des Gehalts an α -amylase-resistenter Stärke (RS-Gehalt) eines Polysaccharids, dadurch **gekennzeichnet**, daß man
 - das eingesetzte Polysaccharid bei Wasserunterschuß
 - inkubiert,
 - danach abkühlt,
 - gegebenenfalls trocknet und
 - ein Polysaccharid mit gegenüber dem eingesetzten Polysaccharid erhöhtem RS-Gehalts gewinnt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch **gekennzeichnet**, daß man einmal oder mehrmals inkubiert.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch **gekennzeichnet**, daß man das Verfahren bei einem Wassergehalt von $\leq 50\%$ und insbesondere $\leq 35\%$ (Gewicht/Gewicht) durchführt, bezogen auf das Gesamtgewicht von Polysaccharid und Wasser.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß man bei eingestelltem Wasserunterschuß die Inkubation bei einer Temperatur T_{Prozess} durchführt, die oberhalb der Glasübergangstemperatur T_G und unterhalb der Umwandlungstemperatur T_{Transf} liegt ($T_G < T_{\text{Prozess}} < T_{\text{Transf.}}$), wobei die Temperatur T_{Prozess} während der Inkubation in dem genannten Bereich schwanken kann.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch **gekennzeichnet**, daß es sich bei der Umwandlungstemperatur T_{Transf} um die mittlere Zersetzungstemperatur des eingesetzten Polysaccharids handelt:
 $T_{\text{Trans}} = T_{\text{Zersetzung}}$.
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch **gekennzeichnet**,
 - (i) daß es sich bei der Temperatur T_{Prozess} um eine Temperatur handelt, die
 - kleiner als die DSC-Endtemperatur T_c (Endtemperatur T_c der dynamischen Differenzkalorimetrie) und/oder
 - kleiner als die DSC-Peak-Temperatur T_p und/oder
 - kleiner als die DSC-Onset-Temperatur T_o ist, wobei
 - (ii) gegebenenfalls die Umwandlungstemperatur T_{Transf} gleich der DSC-Endtemperatur T_c oder der DSC-Peak-Temperatur T_p oder der DSC-Onset-Temperatur T_o ist.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß man zum Trocknen eine Sprüh- oder Gefriertrocknung durchführt.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß man ein Poly-(1,4- α -D-glukan) einsetzt.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch **gekennzeichnet**, daß man von wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukanen) ausgeht, die aus Biotransformation, aus Umsetzung mit Enzymen oder aus Umsetzung von Saccharose mit einem Enzym der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase gewonnen worden sind.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 oder 9, dadurch **gekennzeichnet**, daß die Poly-(1,4- α -D-glukane) chemisch in an sich bekannter Weise modifiziert sind.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8, 9 und/oder 10, dadurch **gekennzeichnet**, daß das Poly-(1,4- α -D-glukan) in 6-Position einen Verzweigungsgrad von höchstens 0,5 % aufweist.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 8, 9, 10 und/oder 11, dadurch **gekennzeichnet**, daß das Poly-(1,4- α -D-glukan) in 2- und/oder 3-Position einen Verzweigungsgrad von jeweils höchstens 1,0 % und insbesondere höchstens 0,5 % aufweist.
13. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 12, dadurch **gekennzeichnet**, daß das Poly-(1,4- α -D-glukan) ein Molekulargewicht von $0,75 \times 10^2$ bis 10^7 , bevorzugt 10^3 bis 10^6 und bevorzugt von 10^3 bis 5×10^5 g/mol aufweist.

14. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 13, dadurch **gekennzeichnet**, daß die wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukane) weder entzweigt, insbesondere weder enzymatisch entzweigt, noch hinsichtlich ihrer Kettenlänge (und damit hinsichtlich ihres Molekulargewichts) reduziert worden sind, insbesondere nicht durch Enzymkatalyse, Säurekatalyse, Extrusion, Oxidation oder Pyrolyse.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß man ein stärkehaltiges Polysaccharid einer Wasserlöslichkeit der Klasse 6 bis 7 gemäß DAB gewinnt (nicht-kaltwasser-löslich).
16. Stärkehaltiges Polysaccharid, erhältlich nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13.
17. Polysaccharid mit hohem Gehalt an α -amylase-resistenter Stärke (RS-Gehalt), dadurch **gekennzeichnet**, daß sein RS-Gehalt und/oder sein Gehalt an Kristalltyp A abnimmt, wenn man das Polysaccharid bei Wasserüberschuß inkubiert, insbesondere bei einem Wassergehalt > 50 % und speziell > 35 % (Gewicht/Gewicht).
18. Verwendung des Polysaccharids gemäß Anspruch 16 oder 17 für Lebensmittel-Vorprodukte oder Lebensmittel.
19. Verwendung des Polysaccharids gemäß Anspruch 16 oder 17 als Lebensmitteladditiv oder Lebensmittelzusatzstoff.
20. Lebensmittel-Vorprodukt oder Lebensmittel, **gekennzeichnet** durch einen Gehalt an einem Polysaccharid gemäß Ansprüchen 16 bis 17.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

BERICHTIGTE FASSUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Juni 2001 (14.06.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/42309 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C08B
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/12459
(22) Internationales Anmeldedatum:
9. Dezember 2000 (09.12.2000)
(25) Einreichungssprache: Deutsch
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
(30) Angaben zur Priorität:
199 59 863.0 10. Dezember 1999 (10.12.1999) DE

(74) Anwälte: MAI, Peter usw.; John-F.-Kennedy-Strasse 4,
65189 Wiesbaden (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, CA, CN, JP, KR,
NO, NZ, RU, US.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

Veröffentlicht:
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(48) Datum der Veröffentlichung dieser berichtigten
Fassung: 12. Juli 2001

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US*): CELANESE VENTURES GMBH [DE/DE]; 65926
Frankfurt (DE).

(15) Informationen zur Berichtigung:
siehe PCT Gazette Nr. 28/2001 vom 12. Juli 2001, Section
II

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): BENGS, Holger
[DE/DE]; Bindingstrasse 3, 60598 Frankfurt am Main
(DE). JACOBASCH, Gisela [DE/DE]; Ahornstrasse 4,
16348 Wandlitz (DE). SCHMIEDL, Detlef [DE/DE];
Gormanstrasse 20a, 10119 Berlin (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD OF INCREASING THE α -AMYLASE-RESISTANT STARCH CONTENT (RS CONTENT) OF A
POLYSACCHARIDE, POLYSACCHARIDES, THE USE THEREOF AND FOOD CONTAINING SAID POLYSACCHARIDES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ERHÖHUNG DES GEHALTES AN α -AMYLASE-RESISTENTER STÄRKE (RS-GE-
HALT) EINES POLYSACCHARIDS, POLYSACCHARIDE, DEREN VERWENDUNG UND LEBENSMITTEL MIT DIESEN
POLYSACCHARIDEN

(57) Abstract: The invention relates to a method of increasing the α -amylase-resistant starch content (RS content) of a polysac-
charide. The inventive method is characterized by incubating the polysaccharide used with less than an equivalent weight of water,
cooling it, optionally drying it and obtaining a polysaccharide that has an increased RS content vis-à-vis the polysaccharide used.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erhöhung des Gehalts an α -amylase-resistenter Stärke (RS-Ge-
halt) eines Polysaccharids, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man das eingesetzte Polysaccharid bei Wasserunterschluß, inkubiert,
danach abkühlt; gegebenenfalls trocknet und ein Polysaccharid mit gegenüber dem eingesetzten Polysaccharid erhöhtem RS-Gehalts
gewinnt.

WO 01/42309 A2

THIS PAGE BLANK (USPTO)